FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1970 N° 1008

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

COHEN-SOLAL Martine - Epouse TEMSTET
Née le 7 avril 1944 à Alger

Présentée et soutenue publiquement le *1970*

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INHIBITION DU TRANSPORT IONIQUE ACTIF PAR LA DIGITALINE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE DES ERYTHROCYTES

ETUDE SUR 45 ECHANTILLONS

Président : Monsieur Michel GAULTIER, Professeur

Imprimerie Technigraphy - Paris

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1970 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

COHEN-SOLAL Martine - Epouse TEMSTET
Née le 7 avril 1944 à Alger

Présentée et soutenue publiquement le *1970*

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INHIBITION DU TRANSPORT IONIQUE ACTIF PAR LA DIGITALINE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE DES ERYTHROCYTES

ETUDE SUR 45 ECHANTILLONS

Président : Monsieur Michel GAULTIER, Professeur

Imprimerie Technigraphy - Paris

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Serment d'Hippocrate.

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples et selon la tradition d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, je n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.
Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; que je sois couverte d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0072

Je dédie cette
thèse

A la mémoire vénérée de

Ma Mère

décédé le 3 Mai 1962

à l'âge de 37 ans.

que cette page de deuil
en tête de cet ouvrage
témoigne de l'immense
douleur qui m'étreint
aujourd'hui.

A mon père,

dont l'exemple courageux m'a permis
d'atteindre le jour.

A mon épouse.

A ma fille.

A toute ma famille.

A tous mes amis.

A Monsieur le Professeur Michel Gaultier

qui a bien voulu accepter de présider
la soutenance de cette thèse.

qu'il soit assuré de mon respectueux
dévouement et de mon infinie reconnaissance

A mon maître le Professeur P. Etienne FOURNIER

Il m'a inspiré le sujet de cette thèse, m'a dirigé pendant son élaboration et me fait bénéficier quotidiennement de son enseignement généreux.

Si je n'ai pas qu'épisodiquement assumer des fonctions d'interne dans son service, ma joie sera grande de pouvoir me dire son élève.

Qu'il veuille bien agréer l'assurance de mon entier dévouement et de ma très vive reconnaissance.

Que Monsieur le Professeur Bourdon

veuille bien trouver ici l'hommage de
ma profonde reconnaissance pour l'accueil
qu'il m'a réservé dans son service,
et les précieux conseils dont il m'a
entouré au cours de expérimentation.

Que Monsieur le Professeur Gabriel Lauricella

veuille bien trouver ici l'hommage de mes sentiments respectueux pour les marques d'intérêt qu'il m'a toujours prodigués pendant mon stage d'externe dans son service.

A mes maîtres des hôpitaux

Stage d'élève.

M. le Pr. Ch. Dehay.
M. le Dr. Ricard
M. le Dr. E. AZERAD.
M. le Pr. J. Baumann.
M. le Pr. J. Lamy.
M. le Dr. C. Fors.
M. le Pr. S. de Sèze.

Externat

1967 M. le Dr. B. Jamain
1968 M. le Pr. G. Laurence
1968.69. M. le Dr. Jh. Baumon.
1969.70 M. le Pr. P.E. Fournier.

A mes maîtres de la Faculté.

en témoignage de mon infinie reconnaissance.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INHIBITION DU TRANSPORT IONIQUE ACTIF PAR LA DIGITALINE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE DES ERYTHROCYTES

ETUDE SUR 45 ECHANTILLONS

I N T R O D U C T I O N

La Digitaline, l'Ouabaïne, inhibent le transport des ions Na^+ et K^+ à travers la membrane cellulaire, en particulier au niveau des cellules myocardiques, des érythrocytes, des cellules nerveuses, des tubules rénaux.

Les travaux les plus anciens ont montré que les glucosides cardiotoniques provoquaient "une perte" en K^+ du muscle cardiaque "in situ" et "in vivo" (WOOD et MOE, I93I, HAGUE I939, BOYER et POINDEXTER I940, ORABONA et MANGANELLI I954, action confirmée par la suite par AIKAWA et RHOADES en I956; RAYNER et WEATHERALL, I957).

Dans les conditions physiologiques normales, sous l'influence d'une excitation, le sodium pénètre dans les cellules, le potassium en sort. A la phase de restitution, le sodium sort et le potassium entre par un processus actif métabolique. Des travaux plus récents ont prouvé que le transport actif était dirigé par la glycolyse et l'A.T.Pase.

Ainsi l'Ouabaïne et la Digitaline n'ont pas d'action sur la sortie du K^+, mais elles diminuent considérablement sa pénétration et provoquent ainsi une diminution du taux intra-cellulaire du potassium.

Le résultat global s'exprimant par une diminution du K^+ intracellulaire accompagné d'un gain de Na^+. (SCHREIBS, ORATS et ROTHSCHILD, I96I).

Il s'agit d'une inhibition du transfert réalisable expérimentalement (RAYNER, WEATHERALL, I957, SCHREIBER, I956, VICK et KAHN, I957). Mais ces résultats sont en désaccord avec ceux de JACOBS et BRENZ, I957, de KLAUS KUNCHINSKI et LULLMANN en I962, qui n'ont pu mettre en évidence de modifications de la cinétique du K 42 dans le coeur traité par des substances digitaliques à doses thérapeutiques.

De même, des recherches récentes montrent qu'aux doses thérapeutiques (10^{-7} M), l'Ouabaïne n'abaisse pas mais, au contraire, est parfois capable d'augmenter légèrement la concentration intra-cellulaire du potassium (KLAUS KUNCHINSKI et LULLMANN en I962; LEE-YUBURSTEIN en I96I).

Cependant, TAESCHLER en I969 mentionne dans les annales d'anesthésiologie Françaises que certains auraient rapporté que l'action inhibitrice de la Digitaline existerait même aux doses thérapeutiques.

Récemment, M.M. BOURDON et MERCIER ont mis au point une technique de dosage de la Digitaline dans le sang et les urines et le Professeur BOURDON, que nous remercions vivement ici, nous a permis d'effectuer notre travail dans son service à l'hopital F.Widal et nous nous sommes proposée:

I) de vérifier l'inhibition du transfert des ions sodium et potassium à travers la membrane érythrocytaire, par la Digitaline à doses toxiques ou fortes concentrations: 10^{-3} M, 10^{-6} M;

2) d'étudier ce qui se passe pour des doses thérapeutiques, soit 10^{-7} M.

LA DIGITALINE ET LE TRANSFERT IONIQUE ACTIF

Inhibition du transfert ionique actif par la Digitaline.

Etude "in vitro"

I/ METHODE D'ETUDE

-Dilutions progressives

-Spectrophotométrie de flamme

II/MATERIEL D'ETUDE

Sang hépariné. Globules rouges, lavés à la solution physiologique, provenant de sujets normaux, recueillis en chirurgie.

-Digitaline Nativelle, ampoules de I ml au I/5 mg du produit actif.

- R B C L à I00 ppm (comme traceur) en solution physiologique.

III/MODE OPERATOIRE

IV/RESULTATS. COURBES.

I) Dans le surnageant

2) Dans les globules

3) A doses toxiques: $IO^{-5}M$, $IO^{-6}M$.

4) A doses thérapeutiques: $IO^{-7}M$.

5) Quelques exemples pour les dilutions supérieures: $IO^{-8}M$, $IO^{-9}M$.

V/ CONSEQUENCES. TENTATIVES D'EXPLICATIONS

A/ METHODES D'ETUDE

I/ PREPARATION DES SOLUTIONS DE DIGITALINE A DILUTIONS CROISSANTES

- A partir de l'ampoule de Digitaline Nativelle I ml. I/5 mg produit actif.
- Obtention d'une solution 10^{-5} molaire:

  2 ml de Digitaline + 18 ml d'alcool ---- 20 ml de solution A

  2 ml de solution A + 18 ml de Dichlorométhane ---- 20 ml de solution à 10^{-5}

  Obtention d'une solution 10^{-6} molaire

  2 ml d'une solution 10^{-5} + 18 ml de Dichlorométhane ---- 20 ml de solution à 10^{-6}.
- Ainsi de suite ----- solution molaire 10^{-8}
- En sachant que la solution molaire 10^{-7} correspond à une dose thérapeutique de 0,10 mg / 24 heures.

II/ SOLUTION DE CHLORURE DE RUBIDIUM A 100 ppm A PARTIR DE LA SOLUTION MERE A 100 ppm (1,4146 g pour 1.000 ml eau bi-distillée).

- Dilution au 1/10 e.

III/ SPECTROPHOTOMETRIE DE FLAMME

Principe (rappel)

SPECTROPHOTOMETRIE DE FLAMME

(Rappel)

En spectrophotométrie de flamme, le principe analytique de la mesure est fondé sur la loi de BEER-LAMBERT qui établit que:

"L'intensité d'un faisceau parallèle de radiation monochromatique décroît exponentiellement quand augmente la concentration du corps absorbant" Ce qui revient à dire que l'absorption du rayonnement lumineux est directement proportionnelle à la concentration de la solution absorbante traversée par ce rayonnement.

Ainsi, l'échantillon à étudier est mis en solution et pulvérisé dans une flamme sous certaines conditons. La lumière émise par la flamme traverse un monochromateur qui en isole le domaine spectral interessant une cellule photo-electrique et un appareil de mesure ou un amplificateur electronique quelconque mesurent l'intensité de la radiation ainsi isolée.

Après avoir correctement étalonné le photomètre sur des solutions de composition et de concentrations connues, on peut facilement faire correspondre l'intensité d'une raie spectrale donnée de l'échantillon inconnu, à une certaine quantité d'un élément qui emet ce rayonnement particulier. §

L'emploi d'un pulvérisateur permet la distribution de l'échantillon dans la flamme. On peut ainsi l'introduire tout entier dans la flamme ou seulement une quantité représentative.

---

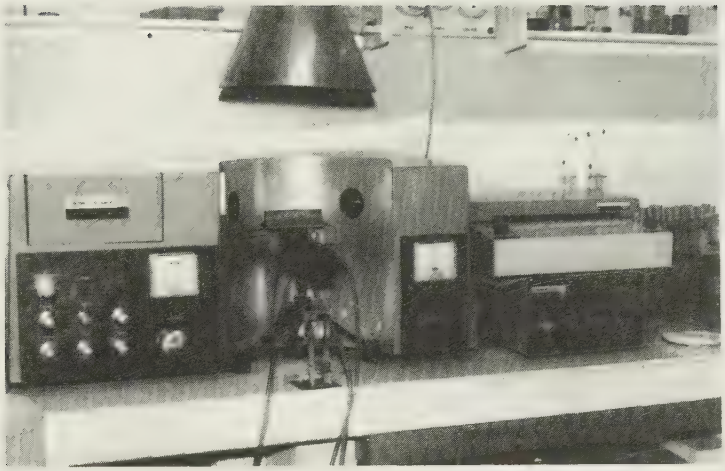
§ Ici nous n'avons pas utilisé de gamme de références. Nous nous sommes attachés à comparer des absorptions directement lues sur le compteur de l'appareil, d'après "Méthodes physiques de l'analyse chimique" p. 245. De H.H. WILLARD, L.L. MERRITT Jr. , J.A. DEAN.

Le photomètre de flamme comporte essentiellement six parties:

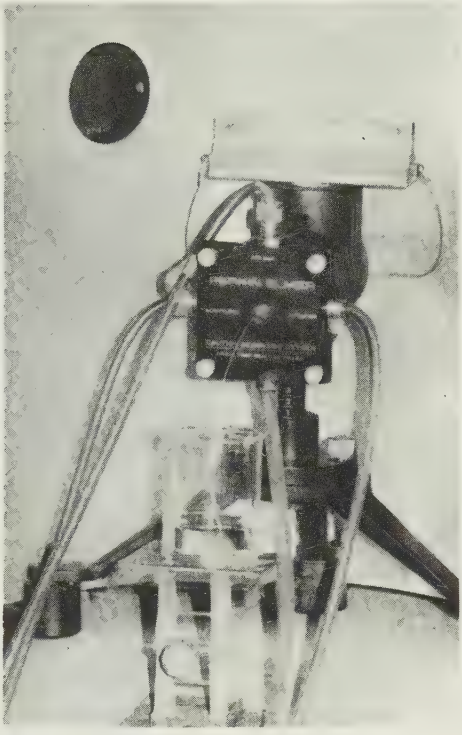
I) Le régulateur de pression, ou débimètre du gaz combustible,
2) Le pulvérisateur
3) Le brûleur
4) Le système optique,
5) Le détecteur-photosensible,
6) L'appareil de mesure.

CONDITIONS D'UTILISATION DU P.E. 303. PAR LES MESURES

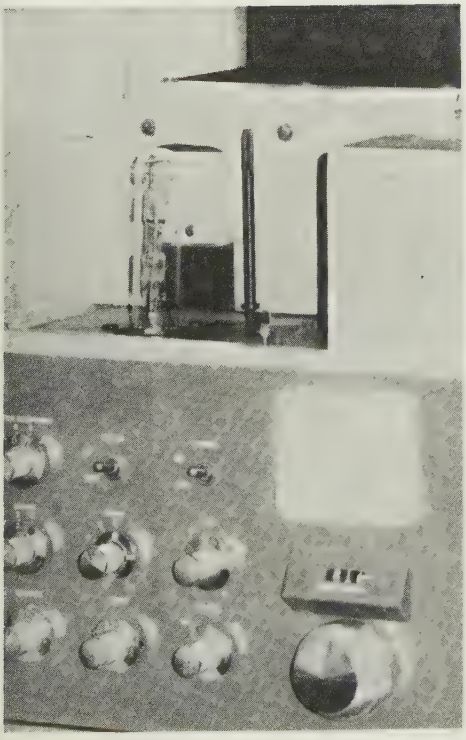
I/ Lampe à décharge au rubidium
2/ Longueur d'onde = 390 m u
3/ Position . . . . . visible
4/ Filtre . . . . . I N .
5/ Intensité . . . . .350 m A
6/ Fente 5
7/ Echelle 2
8/ Temps de réponse . . I
9/ Brûleur . . . . . à trois fentes
I0/ Pressions Acétylène 9 } flamme osydante
AIR 9 }



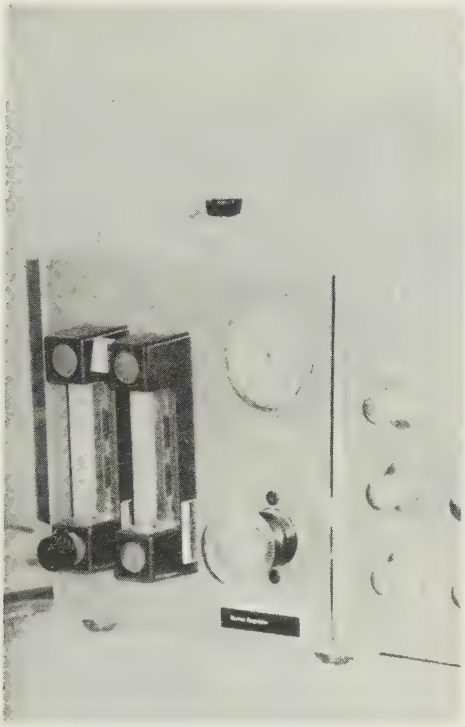
VUE D'ENSEMBLE
DE L'APPAREIL



BRULEUR ET PULVERISATEUR



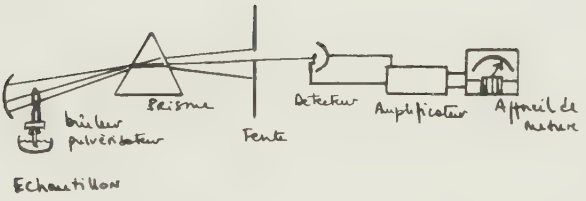
LAMPE A DECHARGE
AU RUBIDIUM ET
BOUTONS DE REGLAGE



REGULATEUR DE PRESSION
OU DEBIMETRE DE GAZ COMBUSTIBLES
AIR - ACETYLENE

UNE SERIE DE TUBES
CONTENANT DE LA DIGITALINE
A DILUTIONS CROISSANTES

SCHEMA SIMPLIFIE D'UN PHOTOMETRE DE FLAMME



D'après H.H. WILLARD, L.L. MERRITT Jr., J.A. DEAN :
" Methodes physiques de l'Analyse Chimique ".

MATERIEL D'ETUDE

I/ SANG

Nous avons recueilli sur trois ou quatre gouttes d'héparine dans un tube à essai le sang de sujets sans aucun traitement actuel, afin de ne pas risquer de se trouver en présence de substances interférant avec la Digitaline au niveau de la membrane cellulaire des globules rouges: de telles substances sont rares, il s'agit de la quinine, de l'imipramine.

Les sujets ont été choisis parmi le personnel hospitalier et des malades venant consulter en chirurgie: sujets de tous âges (cf. courbe N° I).

Après la centrifugation du sang 5.000 T/minute pendant IO minutes, on recueille uniquement les hématies après aspiration et élimination du surnageant.

Les globules sont ensuite lavés trois fois, dans la solution physiologique, centrifugés de nouveau à 4.500 T/ minute pendant dix minutes, et c'est sur les globules ainsi traités que l'on opère.

II/ SOLUTION PHYSIOLOGIQUE MERE

Chlorure de Na	90
Carbonate acide de Na	I,5
Chlorures Mg	I
Phosphate monosodique Na	0,5
Glucose	IO
H_2O bi-distillée Q.S.P.	I.000 ml

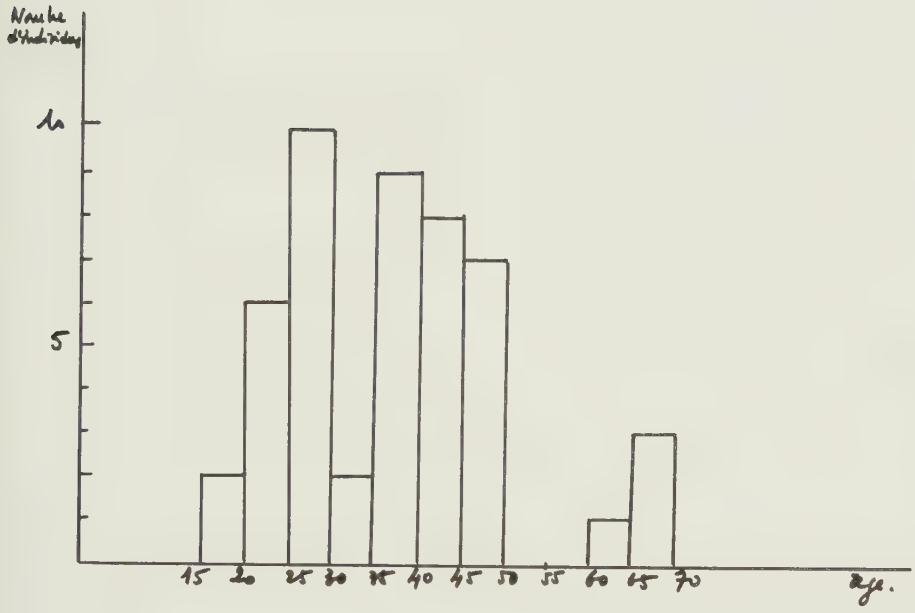
Conservation à 4°.

La solution physiologique utilisée est obtenue à partir de la solution physiologique mère diluée au I/IO e.

III/ DIGITALINE NATIVELLE

Ampoule de I millilitre au I/5 mg --- Q.S. pour les dilutions.

Après obtention de la dilution voulue pour les essais: 0,55 ml de la solution de Digitaline dans le Dichlorométhane sont mis à évaporer dans des tubes à centrifuger de verre.



1. Courbe globale de répartition des sujets échantillons en fonction de l'âge
- hommes et femmes -

IV/ CHLORURE DE RUBIDIUM A 100 ppm. Q.S. POUR OBTENTION

Le rubidium est un métal alcalin, classé dans la même colonne que le sodium, le potassium, le lithium, le césium, dans le tableau de Mendelieff.

Son transfert entre l'extérieur et l'intérieur de la membrane du globule rouge est intimement lié à l'activité de l'A.T.Pase de transport régi par les ions sodium, potassium et magnésium.

On a ainsi proposé de remplacer le potassium marqué par le rubidium pour suivre l'activité de l'A.T.Pase.

MODE OPERATOIRE

I) Les tubes à centrifuger contenant:

- 0,55 ml de Digitaline en solution dans du Dichlorométhane évaporé,

- I ml de globules rouges lavés (soit 20 gouttes), remis en solution dans le liquide physiologique

- sont portés 30 minutes au bain-Marie à 37 °,

- en agitant de temps à autres, de façon à remettre les globules rouges en suspension,

Ce délai de 30 minutes a été déterminé par REPKE et PORTIUS d'abord sur les rats, puis sur l'homme.

Les érythrocytes de l'homme sont beaucoup plus sensibles que ceux du rat, pour lesquels l'inhibition complète serait obtenue au bout d'une heure.

2) Au bout de ce temps de 30 minutes, ce délai nécessaire à une bonne imprégnation des globules rouges par la Digitaline, on ajoute dans chacun des tubes:

- 4 ml de RbCL en solution physiologique à I00 ppm.

- L'on porte l'ensemble des tubes au bain-Marie à 37° pendant 2 heures, constante de temps déterminée par M.M. BOURDON et MERCIER, temps suffisant pour.... allant de I heure 30 à I heure 45.

3) Au temps suivant, les tubes sont centrifugés et les deux fractions, globules et surnageant, sont recueillis pour mesurer le rubidium de part et d'autre de la membrane cellulaire.

On a effectué les mesures sur I ml de surnageant et
- 0,5 ml de globules, soit I0 gouttes hémolysées par de l'eau distillée.

La lecture se fait directement sur le compteur du spectrophotomètre: on lit des absorptions en pourcentages, absorptions que l'on comparera en fonction des concentrations de la Digitaline.

Mais: les temps I et 2 de cette manipulation peuvent se faire en un seul, à savoir globules rouges + Digitaline + RbCL. Il ne semble pas que l'imprégnation primitive par la Digitaline des globules rouges soit indispensable pour que l'action inhibitrice au niveau de l'A.T.Pase membranaire existe.

D'ailleurs, comme le montre la courbe suivante (N° 2), résultant des travaux de WEATHERALL, il n'y a pas grande différence quant-aux résultats obtenus.

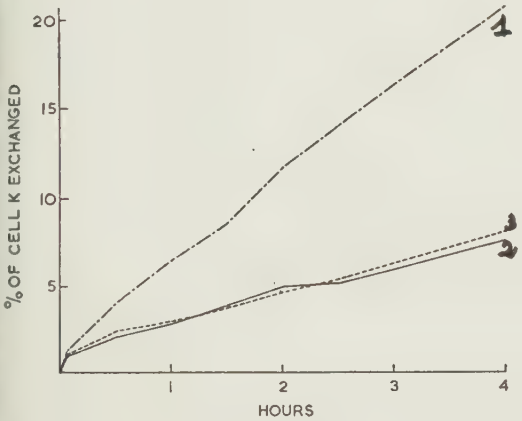


FIG. 2. Effect of previous and of simultaneous exposure to digoxin (10^{-3} M) on uptake of potassium-42 in human red cells.
----- Control
——— Digoxin 1 hour before potassium-42
----- Digoxin and potassium-42 at same time.

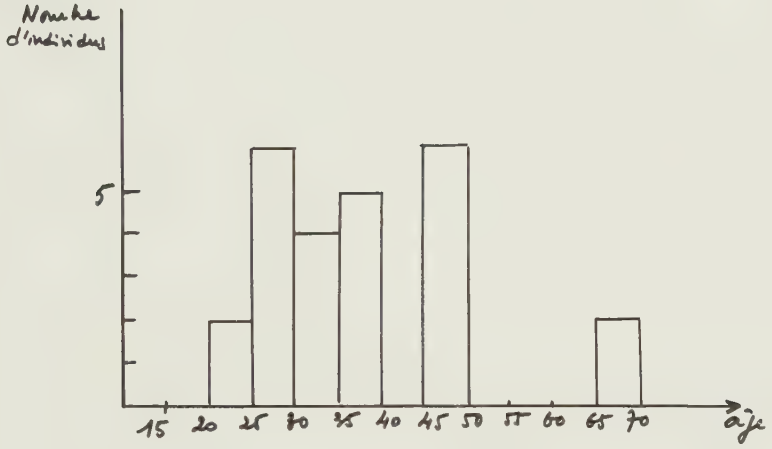
I)Courbe témoins

2)Digoxine une heure avec le potassium radioactif

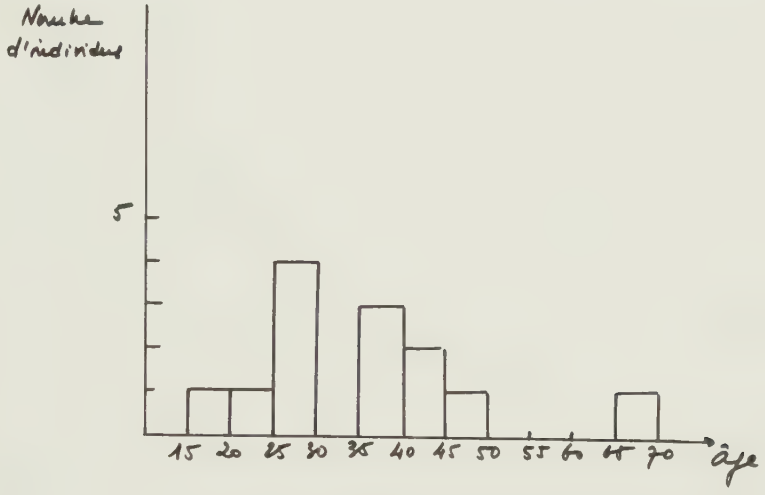
3)Digoxine et potassium mis ensemble

2 et 3 diffèrent très peu.

Certaines de nos manipulations ont été faites dans ces conditions et nous avons obtenu des résultats qui vont dans le même sens que par la méthode en deux temps.



3. Répartition de l'échantillonnage masculin en fonction de l'âge.



4. Répartition de l'échantillonnage féminin en fonction de l'âge.

RESULTATS

Les résultats portent sur 40 échantillons comportant:

24 sujets masculins) dont le nombre en fonction de l'âge
I6 sujets féminins)

se répartissent de la façon mentionnée sur les courbes 3 et 4

Les résultats sont doubles:

-I) Dans le surnageant: c'est à dire que l'on mesure ainsi le rubidium qui n'est pas entré dans les globules, et donc la façon dont l'A.T.Pase membranaire a été inhibée.

-2) Dans les globules: après hémolyse complète par l'eau distillée. Les résultats sont parfois plus nets que pour le surnageant bien que l'on puisse les mettre en doute, en opposant une moins bonne pulvérisation dûe à la fraction protéique intra-globulaire importante

Cependant, un enregistrement automatique au cours des mesures a montré que, d'une façon peut-être surprenante, la pulvérisation des fractions globulaires se faisait de manière homogène. Nous montrons sur la figure N° 5 l'enregistrement d'une mesure intra-globulaire de rubidium chez le même sujet pour des dilutions 10^{-5}, 10^{-6} 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}M. (courbe N° 5)

Outre la certitude d'une inhibition de l'A.T.Pase membranaire, le plateau de ces courbes prouve que, lorsque l'hémolyse est complète, la pulvérisation de la fraction globulaire dans l'appareil est constante et donc valable au point de vue qualitatif.

-3) Dans tous les cas, nous avons fait une mesure O- qui correspond à un simple contact des globules rouges avec le chlorure de rubidium sans Digitaline.

-N°5. Courbes d'enregistrement du rubidium intraglobulaire de Monsieur C.....D, 45 ans
Remarquer l'aspect en plateau pour une hémolyse complète

L'inhibition est très marquée pour les doses toxiques IO^{-5}, IO^{-6}, encore marquée pour IO^{-7} et existant pour IO^{-9}. Pour la dilution IO^{-8}, l'enregistrement n'est pas significatif, peut-être dû à une erreur de manipulation ou encore à des problèmes physico-chimiques évoqués plus bas pour de faibles concentrations.

DANS LE SURNAGEANT

I/ Pour la dilution $IO^{-5}M$, de Digitaline qui s'avère être dans nos conditions expérimentales une dose IOO fois thérapeutique, nous avons constaté dans tous les cas sans aucune exception (cf. tableau I et 2), une inhibition de l'AT.Pase membranaire se traduisant, sur les courbes tracées pour les résultats concernant le surnageant, par une importante élévation du rubidium par rapport au O-, traduisant ainsi ce qui se passe au niveau cellulaire. Vis-à-vis du potassium (cf. courbe N° 6).

Aux dilutions IO^{-6}, $IO^{-7}M$, ce phénomène existe toujours dans des proportions moindres, bien évidemment, mais quantitativement non négligeables, et suffisantes pour laisser penser à une certaine intoxication cellulaire.

On remarquera que les courbes s'étagent pour des pourcentages d'absorption différents, mais les manipulations et mesures ayant été faites par groupe de cinq échantillons, on trouvera toujours un ensemble de cinq courbes allant ensemble (cf. courbes N° 6), proches les unes des autres. Les variations sont dûes à l'appareil, dont les conditions de mesures ne sont forcément pas toujours les mêmes (variations de lampe, courant electrique.....etc).

II/ L'ensemble des courbes représentées (N°6 bis) ont été tracées pour les dilutions IO^{-7}, et quelques IO^{-8}, IO^{-9}, IO^{-IO}.

Dans tous les cas, on peut vérifier que pour IO^{-7} par rapport au O, l'A.T.Pase est inhibée par la Digitaline

Par contre, pour des dilutions supérieures, IO^{-8}, IO^{-9}, $IO^{-IO}M$, dont nous présentons quelques exemples, on assiste à des phénomènes ininterprétables, extrèmement variables d'un sujet à l'autre. Il faut, semble-t-il, penser pour les expliquer beaucoup plus à des échanges globules-paroi, Digitaline-paroi en verre des tubes, donc à un ensemble de variations physiochimiques: rebond des molécules, dislocations.

De toutes façons, ces dilutions IO^{-8}, $IO^{-9}M$ de Digitaline correspondent à des doses IO fois, IOO fois inférieures aux doses thérapeutiques usuelles.

RESULTATS HOMMES

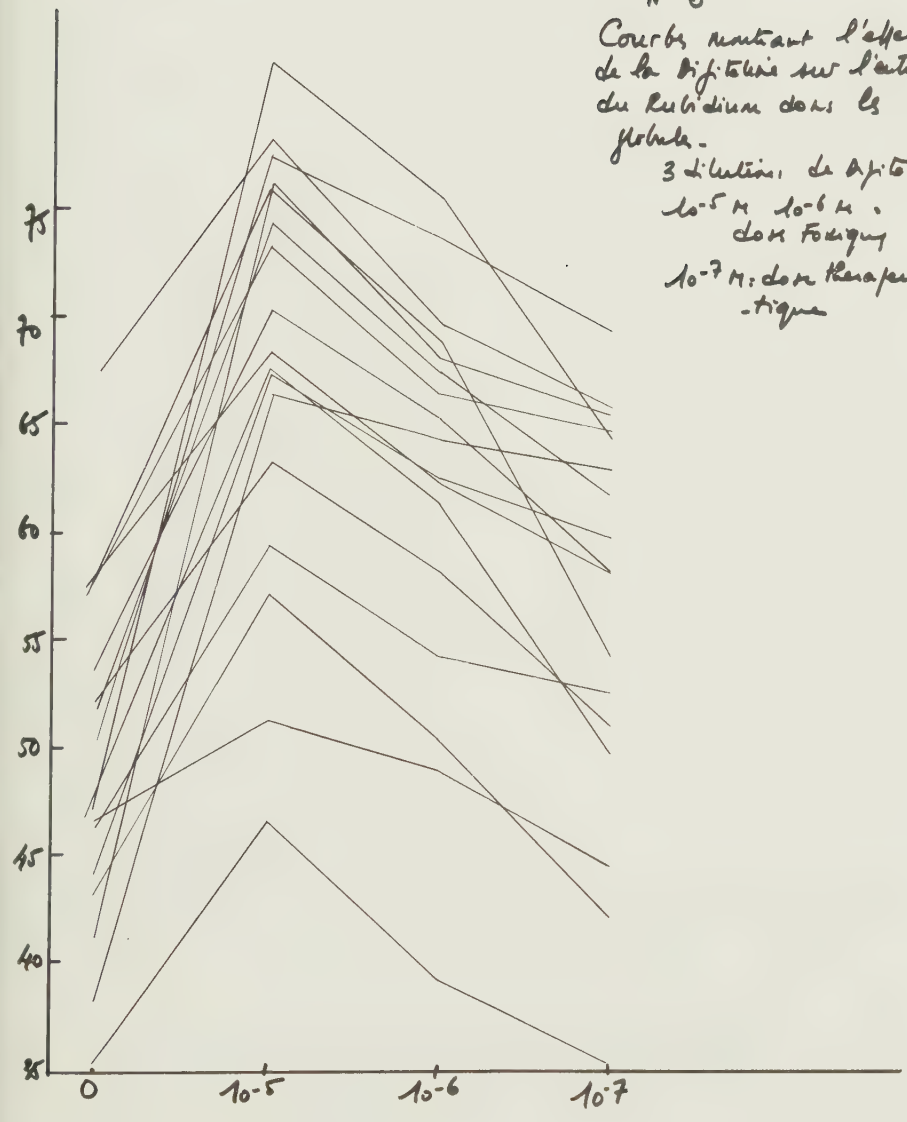
MESURES EFFECTUEES SUR LE SURNAGEANT

		0	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
M.	35 a	50.4	77.6	73.9	69.7	68.9		
Z.	45 a	65.3	79.7	76.5	70.9	69.1		
B.	29 a	67.5	78.2	76.3	74.1	66.9		
P.	28 a	62.1	76.8	75.4	70.3	71.6		
T.	32 a	52.7	78.3	69.8	66	62.3		
N.	35 a	58.2	74.5	66.6	64.9			60.8
C.	27 a	52.3	63.2	58.9	51.3	48.7	48.6	
V.	68 a	41.2	76	69	54.4	43.4		
[illegible]	45 a	52	72.6	70.4	60.1	55.2		
D.F.	47 a	58.1	69	64.8	63.7	56	60.7	61.7
F.	20 a	54	61.9	56.4	56	55.9	49.4	54.3
C.	45 a	38.6	53.3	50.9	42	47.8	40.6	
P.	21 a	43.6	57.4	50.8	42.8	43.5		
S.	25 a	47.5	55.8	52	45.8	40	43.7	
B.	25 a	53.6	62.5	59.4	58.6	56.3	57.2	49.1
H.	33 a	47.8	57.4	61.4	49.9	40.4		
D.	48 a	43.5	51.7	44.9	50.6			
F.	39 a	51.6	57.6	47.5	45.3			
A.	26 a	47.2	60.9	54.1	46.1	41.5		
E.	48 a	41.1	60.5	48	40.1			
B.	65 a	60.4	61.6	61.2	41.2			
[illegible]	36 a	35.3	46.7	39.2	35.5	40.5		
R.	38 a	34.8	44.6	39.4	35.1	31.7		
G.	35 a	37.7	50.8	49.2	45.9	41.3		

RESULTATS FEMMES

MESURES EFFECTUEES SUR LE DURNAGALT

		0	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Simon	40 a	52.4	79.3	78.3	75.1	71		
B.	28 a	58.2	76.3	68.1	65.6	63.3		
N.	45 a	46.5	59.4	54.3	52.8	50.3		
T.	25 a	48	82	75.8	64.5	42.8		
D.	17 a	58.2	68.3	62.4	58.1	52.1	54.9	57.1
W.	19 a	44.3	67.3	62.6	59.9	56.5	45.6	56.5
B.	21 a	46.7	81.2	49	44.6	43.3	44.6	40.4
B.	28 a	43.1	57.2	50.6	43.1	42.4	41.9	
L.	35 a	38.2	66.6	64.5	63	43		
M.	26 a	51.9	74.5	67.6	61.7	56.7		
N.	38 a	53.6	70.2	68.1	58.2	54.2		
Piat	42 a	31.2	45.2	35.2	33.4	33.3		
C.	29 a	36.1	43.7	39.1	33.5	32.5		
T.	68 a	32.6	44.5	37.6	35	32.9		
G.	39 a	32.5	47.3	40.5	35	34.1		
S.	72 a	30.6	44.9	37.9	34.2			

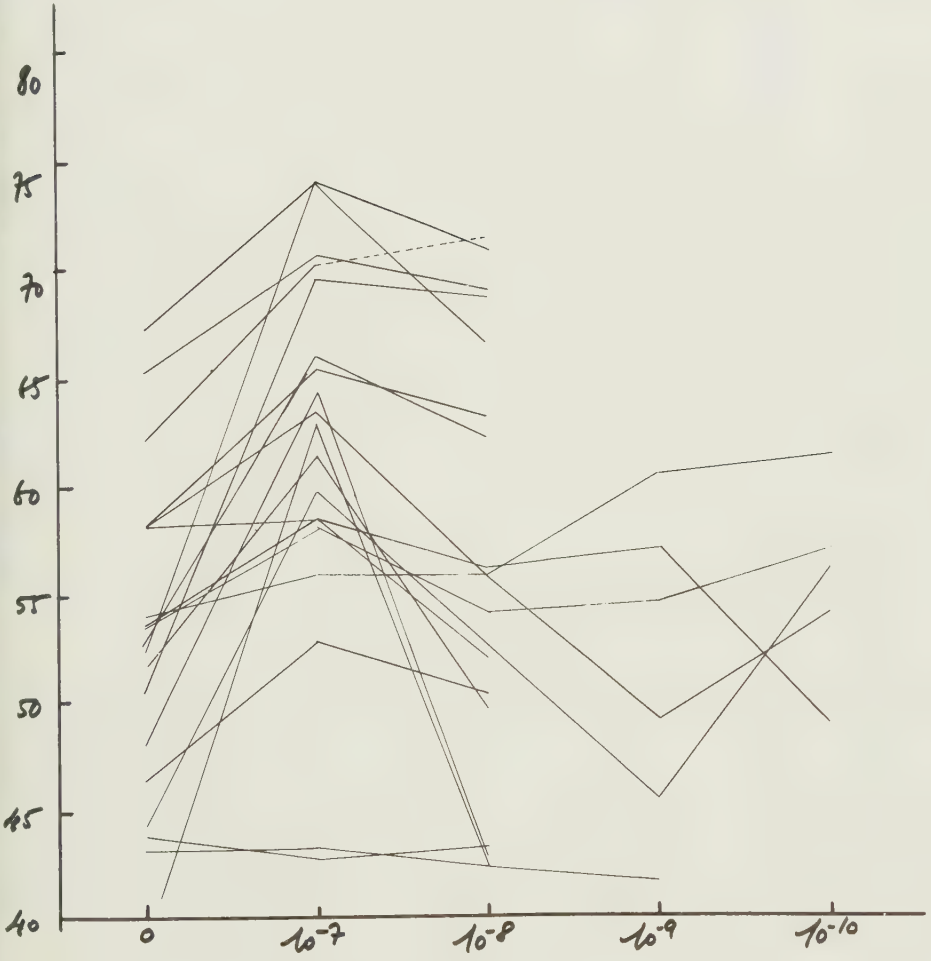


N° 6

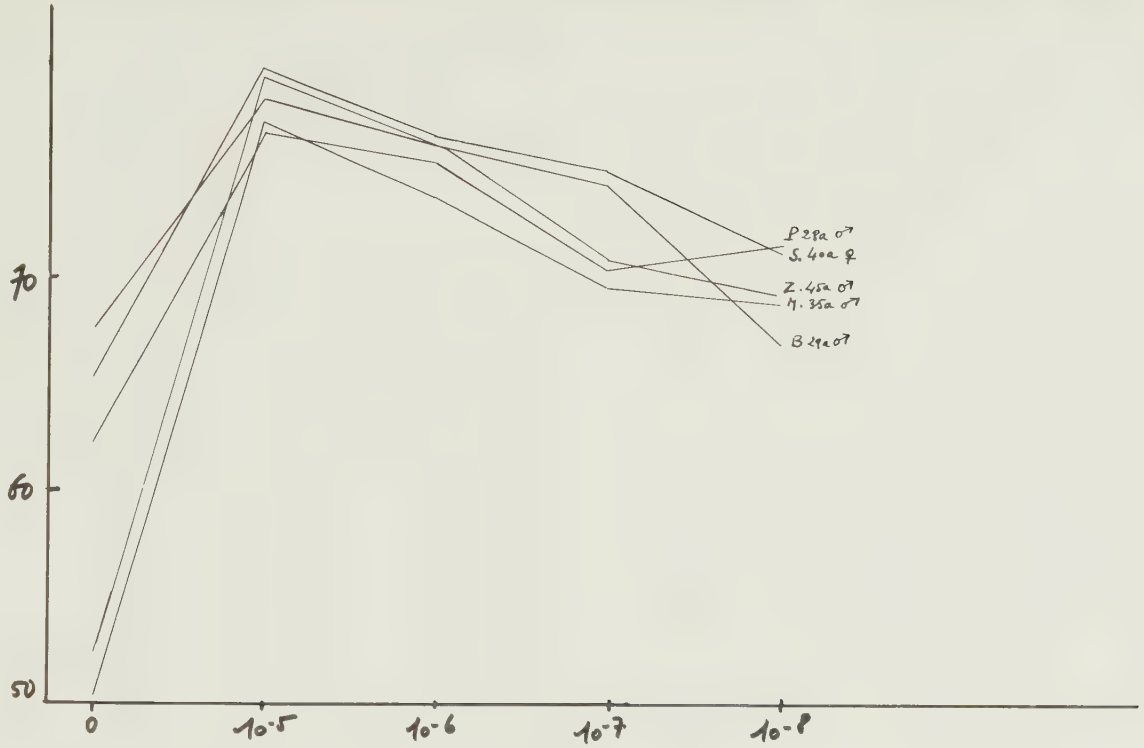
Courbes montrant l'effet de la digitaline sur l'activité du Rubidium dans les globules.

3 dilutions de digitaline 10^{-5} M 10^{-6} M : dose Toxique

10^{-7} M : dose thérapeutique



N° 6 bis quelques exemples pour les dilutions
10^{-7} M 10^{-8} M 10^{-9} M 10^{-10} M.



N°6 ter. Exemple de 5 mesures effectuées le même jour

A L'INTERIEUR DES GLOBULES ROUGES

Les résultats sont encore plus significatifs que ceux obtenus avec le surnageant (tableau N°7)

Pour des doses toxiques: l'inhibition est franche et nette, et ce, dans tous les cas. Après une chute importante du rubidium intra-globulaire, on assiste à une remontée progressive au fur et à mesure que les dilutions de Digitaline mises au contact des globules rouges augmentent, donc lorsque la concentration en Digitaline diminue.

A dose thérapeutique: Le phénomène existe toujours, sauf dans quatre cas, où il s'est avéré qu"une plus grande concentration de rubidium était présente dans les globules à dilution 10^{-7}, que lorsque il n'y a pas de Digitaline dans les tubes, c'est à dire au temps O. Cependant, dans ces cas: en comparant aux résultats trouvés pour le surnageant, il n'y avait pas, comme on aurait pu le soupçonner, ou comme certains l'on prétendu, une certaine facilitation de l'entrée du potassium dans la cellule, pour de faibles concentrations de Digitaline. (cf. tableau N° 8)

En effet, comment relier le phénomène inhibition-intoxication du système cellulaire pour de fortes concentrations de Digitaline, et une éventuelle facilitation de l'action de l'A.T.Pase de transport? Cela semble peu vraisemblable, à moins que le système de transport ne soit lui-même multiple formé d'éléments accélérateurs et d'éléments répresseurs. La Digitaline pourrait agir d'abord sur des répresseurs (à doses très faibles), puis sur les deux groupes à doses fortes.

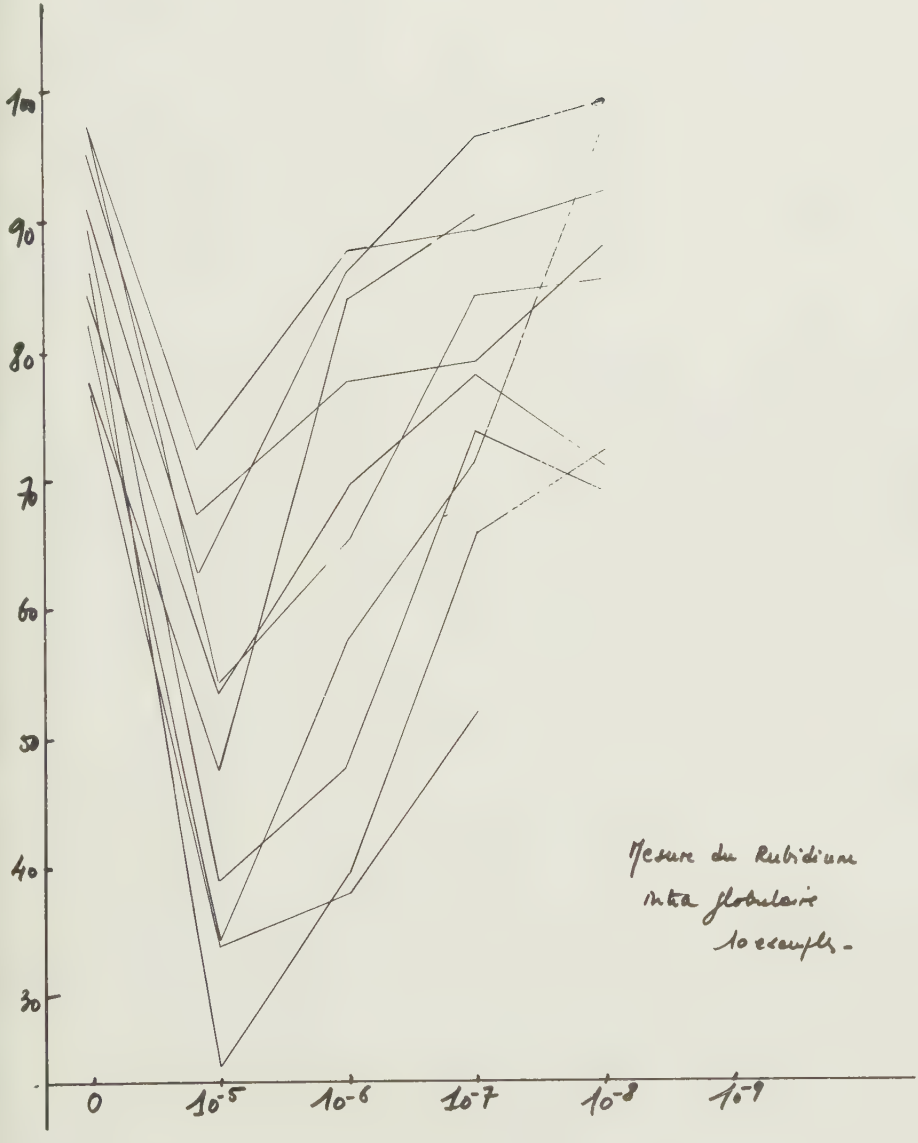
La variation des résultats que nous avons obtenus nous fait plutôt penser à de légères erreurs de manipultion, essentiellement délicate.

Mais encore peut-on se demander si, à de faibles dilutions, le phénomène -qui existe certainement- est encore mesurable de la même façon que pour les doses les plus élevées?

C'est ce que rapportent BRIAN, SINGER et HOFFMAN:----------à propos des mêmes mesures effectuées par d'autres méthodes (méthodes potentiomètriques activité électrique de la fibre myocardique).

TABLEAU N° 7
QUELQUES RESULTATS SUR 20 ECHANTILLONS
DANS LES GLOBULES ROUGES

		0	5	6	7	8	9
P	h	89.I	38.2	57.8	73.7	68.I	
B	f	84.5	53.9	69.6	77.8	7I.3	
S	h 25	76.7	32.I	57.I	7I	96.3	87.I
C	h	85.8	24.5	39.I	65.4	7I.7	
B	f	96.6	54.5	64.8	83.8	84.I	76.7
D.P.	h	95.I	67.2	78.2	79.2	88.6	83.9
B		7I.00	76.3	94.8	5I.00		
D		90.6	6I.8	87.2	95.9	98.9	96.2
W		96.6	73.7	88.5	89.2	9I.2	88.6
F		77.7	72	90.2	8I		
S		8I.2	34.4	37.8	5I.2		
M		76.3	46.9	84.4	90.2		
E.		74.I	32.3	46.7	70.3		
Z		87.3	32	5I.7	64.I		
B		72.8	46.7	54.4	47.8	84.6	
P		90	40.4	62.2	8I.2		
C		6I.9	33.3	34.I	43.2	49.9	
N		56.I	37.I	5I.6	55.9		
V		44.6	24.5	39.6	42.I		



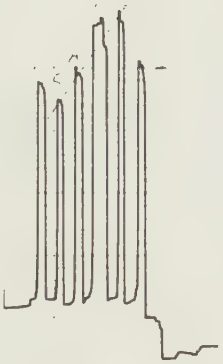
Mesure du Rubidium
intra globulaire
10 exemples.

TABLEAU COMPARATIF DE MESURES EQUIVOQUES
SURNAGEANT ET GLOBULE
N° 8

		0	5	6	7	8
B h 25 ans	Surnageant	53.6	62.5	59.4	58.6	
	Globules	2I.00	76.3	94.8	2I.00	
D f I7 ans	Surnageant	58.2	68.3	62.4	58.3	52.I
	Globules	95.9	6I.8	87.2	90.6	98.9
F h 2I ans	Surnageant	54	6I.9	56.4	56	
	Globules	2I.00	72	90.2	77.7	
B h 29 ans	Surnageant	67.5	7I.2	76.3	74.I	66.9
	Globules	84.6	46.7	54.4	47.8	72.8

Nota

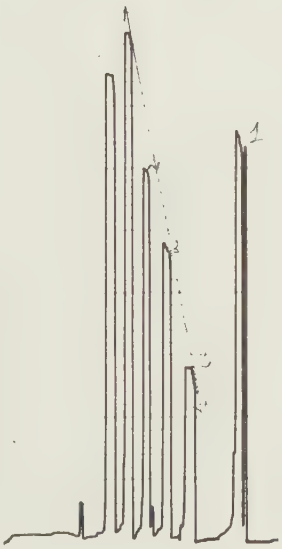
5 ----- dilution 10^{-5}M
6 ----- " 10^{-6}M
7 ----- " 10^{-7}M
8 ----- " 10^{-8}M
9 ----- " 10^{-9}M



S.....25 ans

Enregistrement automatique réalisé au cours des mesures

A : Rubidium dans le surnageant (haut) A



B : I ----- correspond au temps 0 globules rouges = rubidium

2------ dilution IO^{-5}

3------ " IO^{-6}

4------ " IO^{-7}

5------ " IO^{-8}

6------ " IO^{-9}

L'aspect le plus net est celui réalisé au cours de l'enregistrement du rubidium intraglobulaire.

On note une forte diminution de l'entrée du rubidium dans le globule, lorsque la Digitaline est présente à forte concentration, IO^{-5} M par rapport au temps 0: où ne sont présents que les globules rouges et chlorure de rubidium puis, lorsque la quantité de Digitaline décroît, le rubidium entre progressivement et de plus en plus dans les cellules, sauf pour IO^{-9} où il semble y avoir un certain ralentissement de ce phénomène.

Mais, pour de telles dilutions (10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}), il semble beaucoup plus logique de penser à un phénomène de paroi entre la Digitaline et les tubes, plutôt qu'à une inhibition du transport actif qui, en fait, n'a plus aucun intérêt pour nous à de telles dilutions proches des doses homéopathiques.

TENTATIVES D'EXPLICATIONS . CONSEQUENCES

Un certain nombre de questions se posent, à la lueur de ces observations. Bien sûr, de nombreuses inconnues demeurent quant à l'action de la Digitaline sur le coeur, en état d'insuffisance cardiaque. Des travaux de plus en plus nombreux nous permettent d'entrevoir un peu mieux les différents mécanisme d'action qui semblent s'intriquer.

Cependant la possibilité de comparer l'usage expérimental et l'utilisation clinique de la Digitaline fait souvent défaut, car l'état du coeur est très différent selon les cas. Comment comparer l'insuffisance cardiaque créée expérimentalement sur un animal sain et l'insuffisance cardiaque observée en clinique? Cela reviendrait à homologuer les résultats obtenus dans l'insuffisance cardiaque des valvulopathies et dans celle des hyperthyroïdies.

De même, lorsque l'on considère les effets de la Digitaline sur des tissus isolés, ici les globules rouges humains, bien des altérations observées peuvent être dûes dans une large mesure aux modifications du milieu et à l'état du tissu et non pas au temps d'exposition de la digitale, ni à sa concentration.

Ces considérations soulignent le caractère obligatoirement aléatoire des tentatives expérimentales qui s'efforcent d'élucider le mécanisme par lequel la digitale modifie l'activité du coeur humain.

Quant-à l'action thérapeutique et toxique de la digitale, il semble que le mécanisme d'action puisse s'expliquer par le même processus, l'intoxication représentant un excès de l'action thérapeutique, il ne s'agit pas de deux processus dissociables:

I/ Peut-on expliquer les phénomènes d'hyperkaliémie observés au cours d'intoxication digitalique par la seule inhibition du transfert ionique actif? Y a-t-il un autre processus qui intervienne?

2/ A quels mécanismes rattacher les effets suppressifs de l'ion potassium vis-à-vis de manifestations toxiques de la Digitaline? Conduite thérapeutique pratique?

3/ Notions de dose thérapeutique et de dose toxique.

4/ Application: dosage de la Digitaline dans le serum et l'urine.

I/ Une des dernières études de 70 cas d'intoxication digitalique massive, dans le service du Professeur M. GAULTIER, rapporte que la kaliémie moyenne chez 70 malades est de 4,76 meq/ litre ± I,76 meq/ litre, alors que la moyenne à l'entrée de 70 témoins est de 3,56 ± 0,35 meq/ litre. Chez 8 malades, la kaliémie à l'entrée est supérieure à 6 meq/ litre. L'hyperkaliémie est durable, puisque la moyenne au second jour est de 4,5 meq/ litre et au troisième jour de 4,2 meq/ litre. Donc encore loin de la valeur normale.

Cette hyperkaliémie s'explique-t-elle seulement par une action bloquante à l'entrée du potassium, par la Digitaline au niveau cellulaire?

D'une part:

I) Quand on administre par voie intraveineuse à l'animal non digitalisé la quantité de potassium que l'on sait être libérée sous l'effet de la Digitaline, on ne retrouve pas dans les prélèvements faits peu de temps après d'augmentation significative de la kaliémie. On a pu établir pour des études du gradient potassium artério-veineux musculaire que la raison en était la pénétration dans les muscles squelettiques et cardiaques du potassium, chez le sujet normal. Or cette pénétration est justement inhibée par la Digitaline puisque ce phénomène n'est pas limité aux cellules myocardiques, mais touche également les globules rouges, les tubules rénaux, les cellules nerveuses.

2) Des expériences ont montré chez le chien soumis à une forte digitalisation une forte augmentation du potassium avec chute de sodium.

Or, la forte augmentation du potassium dans le sang des sinus coronariens est insuffisante pour expliquer l'hyperkaliémie observée.

Il ne parait pas non plus que beaucoup de potassium vienne du muscle squelettique. La source semble être le foie, comme l'ont montré des cathétérismes veineux hépatiques. L'hyperkaliémie obtenue chez l'animal fortement digitalisé est donc dûe à un double mécanisme de libération, surtout hépatique et d'inhibition de la pénétration musculaire. Elle peut atteindre des taux mortels.

II/ Cliniquement, l'exagération de l'action digitalique par l'hypokaliémie, -surtout évidente après un large usage des diurétiques de type thiazidiques, ou encore chez les malades fortement digitalisés soumis à l'hémodialyse si elle réalise une déplétion potassique massive- est confirmée par le travail expérimental de LOWE (1957): il faut cinq fois moins d'acétyl stropantidine pour déclancher une tachycardie ventriculaire, si le potassium sanguin est inférieur à 2 milléquivalents et trois fois plus quand la kaliémie est supérieure à 8 milliéquivalents.

Une hypothèse interessante repose sur des expérimentations qui montrent qu'en augmentant le taux du potassium dans le liquide de perfusion extra-cellulaire au delà d'un point critique, on supprime l'inhibition par la Digitaline de la fixation du potassium par les hématies et les fibres cardiaques.

Il est interessant de se demander si le potassium pourrait ainsi en quelque sorte, réactiver plus ou moins le système de transfert actif intoxiqué. A cet égard, il faut noter que la supression de l'action toxique de la digitale par le potassium peut n'être que transitoire si l'augmentation de la concentration en potassium n'est pas maintenue pendant un temps suffisant, ce qui laisserait penser que la réversibilité précoce induite par le potassium précède la réactivation complète du transfert et qu'elle est peut-être dûe à un mécanisme différent.

Ainsi a été imaginé un système de sites spécifiques de la Digitaline, dont la Digitaline serait déplacée par les ions K^+ dans certaines limites de concentration.

L'idée que l'A.T.Pase de transport serait un récepteur spécifique des substances digitaliques (REPKE, 1964) se précise ainsi rapidement.

CONDUITE THERAPEUTIQUE PRATIQUE

(D'après le travail de Martine LAMOTTE dans le service du Professeur GAULTIER)

L'administration d'ions potassium doit, semble-t-il, être systématique chaque fois qu'existe une hypokaliémie. Il faut maintenir une kaliémie à la limite supérieure de la normale.

Ceci peut être réalisé:

-I) soit par un apport lent et continu de sels du potassium,

-2) soit par un apport massif et discontinu en espérant ainsi réduire un trouble majeur de l'automaticité (ce qui n'a jamais été réalisé par les auteurs qui rapportent ces notions).

En cas d'hyperkaliémie, il vaut mieux renoncer à la thérapeutique potassique: elle reste éminemment dangereuse et ne pourrait être tentée que si une sonde endo-cavitaire a été posée.

III NOTIONS DE DOSES THERAPEUTIQUES ET DOSES TOXIQUES OU PLUS EXACTEMENT EFFET THERAPEUTIQUE - EFFET TOXIQUE

I/ En clinique, l'action thérapeutique de la Digitale est celle qui entraine ou provoque la modification souhaitée de la fonction cardiaque. Mais, en clinique, la digitale est employée dans des buts très différents.

Puisque l'efficacité du coeur est améliorée par l'action inotrope positif de la digitale, la dose nécessaire pour obtenir cet effet peut alors définir la dose thérapeutique.

On peut utiliser au laboratoire la même définition pour désigner une concentration de digitale suffisante pour provoquer un effet inotrope positif. Les définitions ne sont toutefois pas comparables, puisque l'utilisation clinique s'associe à un effet bénéfique maintenu pendant des jours et des années.

Au contraire, une concentration de digitale qui améliore au début la contractilité d'une préparation isolée du muscle cardiaque provoque habiuellement à long terme une perte de contractilité et contracture.

Cliniquement, une dose (et un effet thérapeutique) de digitale peuvent être définis en fonction de la modification désirée du rythme ou de la fréquence cardiaque.

Une telle modification peut être le résultat indirect de l'effet inotrope de la digitale ou de la forte élévation de son action vagale.

IV Une première application pratique a déjà été tirée du fait précédent:

Il s'agit du dosage de la Digitaline sur des échantillons de sérum ou même sur l'urine des sujets intoxiqués,

dosage mis au point à la Pharmacie de l'Hopital Fernand WIDAL par le Professeur BOURDON et MERCIER et que nous avons repris dans notre étude.

Modalités pratiques

Après avoir obtenu un extractum (contenant de la Digitaline à doser), à partir de sérum ou d'urine du sujet, on ajoute une certaine quantité de solution physiologique, contenant en suspension des globules rouges de sujets sains.

On incube 30 minutes en bain-Marie à 37°, en agitant de temps à autres.

On ajoute ensuite la solution physiologique contenant du chlorure de rubidium 50 ppm, et on incube 2 heures au bain-Marie à 37°.

On centrifuge et l'on introduit 2 millilitres de surnageant (donc mesure effectuée ici uniquement sur le surnageant), 2 millilitres de solution physiologique.

MESURES

On détermine au Perkin ELMER (spectro photomètre), la concentration du rubidium dans le liquide surnageant.

La concentration en hétérosides cardiotoniques présente dans l'échantillon à doser est alors calculée à partir d'une courbe étalon obtenue simultanément et dans des conditions strictement identiques à l'aide de quantité connues de Digoxine et de Digitoxine.

(Les courbes que nous avons présentées plus haut sont en quelque sorte des gammes étalons).

Nous présentons quelques résultats de dosages de Digitaline chez des sujets intoxiqués.

A titre d'exemple: (tiré de M.M. BOURDON et MERCIER ref 4)

I) Concentration obtenue chez quelques patients recevant de la Digoxine à titre thérapeutique.

- Digitoxine 0,10 à 0,20 mg/24 heures

  Concentration plasmatique 2 à 20 ug/ml

  Concentration urinaire 5 à 10 ug/ml

- Digoxine 0,25 à 0,50 mg/24 heures

  Concentration plasmatique 1 à 5 ug/ml

  Concentration urinaire 30 à 80 ug/ml

2) Concentration plasmatique et urinaire observées lors d'intoxications massives par les digitaliques.

Le tableau suivant réunit des mesures qui ont pu être effectuées dans des cas d'intoxications massives par les digitaliques utilisés à des fins de suicide.

Quantité de digitoxine absorbée per os	temps écoulé depuis l'absorption/heures	concentration plasmatique ug/ml	concentration urinaire ug/ml
2 mg	2	42,5	65
	7	57,5	75
3,3 mg	2	55	-
	4	110	120
	8	105	110
	12	115	50
	36	40	-
4,5 mg	1	90	45
	25	90	-
	115	45	92
10 mg	6	260	500
	30	160	-
	54	80	-
10 mg	4	300	400
	28	270	380
	52	260	365
	76	250	350
	100	210	350
	124	170	350
	148	150	140
	172	100	120
15 mg	4	320	

Le décès est survenu 14 heures après l'ingestion

C O N C L U S I O N

Comme l'ont montré les travaux de REPKE en 1960, les glucosides cardiotoniques provoquent une inhibition du transport ionique actif effectué par l'A.T.Pase.

Nous nous sommes proposés de vérifier ce fait au niveau de la membrane des érythrocytes in vitro, à doses toxiques (10^{-5}M, 10^{-6}M, d'une part, et à doses thérapeutiques 10^{-7}M, d'autre part, en utilisant un sel de rubidium comme élément traceur proche des sels de potassium.

Nous avons constaté:

1°) Dans tous les cas, sans aucune exception, sur 45 échantillons de sang prélevé sur des sujets de tous âges, hommes et femmes, une très forte diminution de l'entrée du rubidium dans les cellules pour les doses toxiques considérées, et ce, pour certains échantillons, par une double mesure sur le surnageant et sur les globules.

2°) A doses thérapeutiques 10^{-7}m, le phénomène existe en proportions moindres, mais encore mesurables pour 40 échantillons sur 45.

3°) Pour des dilutions plus grandes, 10^{-8}M, 10^{-9}M, et parfois même 10^{-10}M, nous avons étudié quelques échantillons; les résultats sont moins nets et parfois inverses, ce qui peut faire penser à une double organisation du système de transport, qui serait composé à la fois d'éléments accélérateurs et d'éléments inhibiteurs sur lesquels la Digitaline agirait à doses différentes.

Il est certain que la Digitaline au niveau de l'A.T.Pase de transport ionique de la membrane cellulaire des érythrocytes, exerce une action inhibitrice, ceci pour des doses toxiques et pour des doses thérapeutiques.

Il faut noter que cette enzyme est activée par les ions magnésium et inhibée par les ions calcium et qu'il serait interessant de pouvoir mesurer ce qui se passe au niveau de la cellule myocardique investigations qui pourraient se faire au cours d'interventions chirurgicales par prélèvements d'un fragment de pyocarde chez les sujets, traités ou non.

Le modèle érythrocytaire permet dès maintenant une étude toxicologique précise au cours des intoxications aigües digitaliques et même au cours d'une thérapeutique courante.

Vu, LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR Michel GAULTIER

Vu, LE DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE

PROFESSEUR Georges BROUET

Vu, et permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADEMIE DE PARIS

R. MALLET

BIBLIOGRAPHIE

I. AHMED (K.) et JUDAN (J.D.). On the action of strophantin -G. Canadian J. Biochem. I965, 43 7, 877-880.

2. BOUYARD (P.). (Montpellier). Action des substances digitaliques sur l'équilibre ionique au niveau de la fibre cardiaque. Ann. Anesthésiologique Française. I964, (Avril, Mai, Juin) V.2.

3. BRIAN (F.), HOFFMAN, et SINGER (D.H.) Les effets de la digitale sur l'activité électrique de la fibre myocardique. Acquisitions nouvelles en pathologie. I964, 7, 249-286.

4. BOURDON et MERCIER. Dosage des hétérosides cardiotoniques dans les liquides biologiques par spectrophotométrie d'absorption atomique. In annales biologiques cliniques. I969. 27,I0,I2 65I-657.

5. CAPIO (A.) et FARAH (A.) The effects of ionic milieu on the response of rabbit cardiac muscle to ouabaïne. J. of Pharmacology ans experimental therapeutic. I967,I55:403-4I4

6. FOURNIER (P.E.) et LECHAT (P.). In"Coeur et Toxiques". IX Réunion des centres de Poison.Avril, Mai, Juin I965.

7. GEORGES (A.) Mécanisme d'action des hétérosides de la digitale (physique et chimie de la contraction cardiaque). In "Les hétérosides cardiotoniques de la digitale et leurs dérivés semi-synthétiques". Paris, I967. Maloine, Ed. Chap. V. 75-9I.

8. GLYNN (I.M.). The movements of wates and salts through natural membrany. ATPase and cardiac glycosides. Symposium on water and electrolytes metabolism. Amsterdam, I96I.

9. GLYNN (I.M.). The action of cardiac glycosides on ions movements. Pharmac. Rev. I964, I6; 38I-407.

IO. JACOBS (G.) and BRENZ (H.). Effects of digoxin on potassium transfer on the prof heart. Philadelphia, Pa.

II. JACOBSON (A.L.). Effect of ouabaïn on the ATPase of cardiac myosis B at High ionic strenth. Circulation research. I968, 32, 55, 625-632.

I2. LABORIT (H.) LETESSIER et BRUC.
Les glycosides tonicardiaques.
In "Les régulations métaboliques: aspect théorique, expérimental, pharmacologique et thérapeutique". Masson Ed.Paris I965 pp.328 - 340.

I3. LAMOTTE-DENTAN (M.).
Intoxication digitalique massive. Etude de 270 observations.
Thèse, Paris I96..

I4. LUBLIN (R.J.) et CONN Jr. (H.L.)
Les effets cellulaires de la digitale: réalités, fiction et hypothèses.
Acquisitions nouvelles en pathologie cardio-vasculaire. I965, 7 4, 367- 37I.

I5. MATSUI (H.) et SCHWARTZ (A.).
Mechanisms of cardiac glycosides inhibition of the Na^+K^+ dependent ATPase from cardiac tonic biochemical biophysic Acta. I968. I5I, 655-663.

I6. MAURAT (J.P.).
Pharmacologie des glucosides cardiotoniques.
Coeur et médecine interne, I963, Tome II, N° 3.

I7. MOE (G.K.) et FARAH (A.E.).
Digitalis and allied cardiac glycosides.
In "The pharmacological basis of therapeutic". Goodman and Gilman, Ed. Mac Millan C°.
Third Edition, I965, 3I th Chapter, P.679.

I8. REPKE - PORTIUS (H.J.).
Uber die identität der ionenpuopen atpase in der Zellmembran des Hetz-muskels mit einen digitalis Merpto-enzym Experientia. I963, I9, 9452-9458.

I9. REPKE (K.).
Effect of digitalis on membran ATPase cardiac glycosides.
IIe Congrès International de Pharmacologie, Prague I963.
Ana. in biochemical Pharmacology. I963 Suppl.au vol. I2 N°374-I07.

20. REPKE (K.).
Influence of cardio active principles on Pump ATPase.
In "Proceedings of the first international pharmacological meeting Stockholm, I963, Vol. III. New aspect of cardiac glycosides.
W. Wilbradt, Ed. Per Press, New-York, I963, pp. 65-73.

2I. REPKE (K.) et PORTIUS (H.J.).
Effets comparatif des lactones stéroïdes sur l'A.T.Pase de transport et sur les transports d'ions dans les érythrocytes.
Folia Hoematolog. I965, B I08-II6.

22. SCHWARTZ (A.), ALLEN (J.C.), HARIGAYA (S.).
Possible involvement of cardiac $Na^{+}K^{+}$ admissive triphosphase in the mecanism of action of cardiac glycosides.
J. of Pharmacology and experimental therapeutics.I965, I68 I, 3I-4I.

23. SLAMA (R.).
Digitalisation et troubles du rythme.
Actualité cardiologique, I963, P.37.

24. TADEI (A.)
Notions actuelles sur l'action des digitaliques.
Rev. de Med. de Tours, I965, 3 - 6, 583-594.

25. TEASCHLER (M.).
Conceptions actuelles sur le mécanisme d'action des glucosides des cardiotoniques.
Ann. Anesthésiologie Française. I964, (Avril, Mai, Juin). V.2.

26. WEATHERALL (M.).
Action of cardiac glycosides on ionic movements. Enzyme and drug action.
Ciba Foundation, Londres I962.

27. WEATHERALL (M.) .
Ions and the action of digitalis.
British H eart J. I966, 28, 497.

28. WEATHERALL (M.).
Ions and fluctuation of digitalis.
British heart journal. I966, 28 4, 497-504.